

干血滤纸片试剂盒和水煮法提取 间日疟原虫 DNA 用于 PCR 检测的比较

胡明洁^{1,2} 吴守伟² 刘 辉² 张 静² 方 强³ 沈继龙¹

[摘要]目的:比较水煮法和干血滤纸片基因组 DNA 分离试剂盒提取间日疟原虫 DNA 用于 PCR 检测及克隆研究的差异。方法:采集间日疟患者末梢血制备干血滤纸片,分别用水煮法和 QIAamp DNA mini kit 试剂盒提取间日疟原虫基因组 DNA 10 份。PCR 扩增 LDH 基因,并克隆质粒 pGEM-PvLDH。分析比较 2 种提取方法的差异。结果:水煮法和试剂盒法提取的间日疟原虫 gDNA 均扩增出 LDH 基因特异条带,但试剂盒提取的 gDNA 目的条带亮于水煮法。结论:水煮法操作简便、快速、经济,在等量血源条件下,所得 DNA 量较少、纯度较低;试剂盒提取可获得较高的得率,在定量检测和复合扩增时受到的影响因素较少,成功率较高。

[关键词] 间日疟原虫; DNA 提取; 干血滤纸片; 聚合酶链式反应

[中国图书资料分类法分类号] R 382.31 **[文献标识码]** A

A comparative study of dried blood spot genomic DNA isolation kit and boiling method in DNA extraction and PCR detection of *Plasmodium vivax*

HU Ming-jie^{1,2}, WU Shou-wei², LIU Hui², ZHANG Jing², FANG Qiang³, SHEN Ji-long¹

(1. Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei Anhui 230031;

2. Department of Bioscience, 3. Department of Microbiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the differences of dried blood spot (DBS) genomic DNA isolation kit and the boiling method in DNA extraction, PCR and cloning of *Plasmodium vivax*. **Methods:** The peripheral blood was collected from vivax malaria patients and the dried blood spots were prepared. The genomic DNA of ten samples was extracted with boiling method and QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany). The lactate dehydrogenase (LDH) gene was amplified by using the extracted DNA as template. The amplified fragment was purified and cloned into pGEM vector. The differences of both methods were analyzed and compared. **Results:** The target fragment of LDH gene was amplified with the gDNA extracted by the both methods; but the electrophoretic bands with the template by kit method were obviously brighter than that by boiling method. **Conclusions:** The boiling method is a simple, rapid and economical way in extracting gDNA from the dried blood spots; but in a given amount of blood sample, the extraction rate and purity of DNA are lower; while the extraction kit, with a higher extraction rate, is less affected by in the quantitative analysis or multiplex PCR.

[Key words] *Plasmodium vivax*; DNA extraction; dried blood spots; polymerase chain reaction

疟疾是一种严重危害人类健康的感染性疾病,据 WHO 2010 年发布的数据^[1]显示,全球受到间日疟原虫感染威胁的人口高达 26 亿,我国大部分流行区均以间日疟流行为主。因为不会导致类似于恶性疟的高病死率,间日疟常常被认为是一种良性疟疾,所以间日疟原虫的危害一直以来被低估。但近年来

研究^[2-5]发现,间日疟如果反复发作可导致患者虚弱,并可引起诸如脑型疟、急性呼吸窘迫综合征、肝脏功能衰竭、循环衰竭、严重贫血等危及生命的并发症。

分子生物学技术用于疟原虫感染检测及不同种类疟原虫鉴别,具有操作简便、特异性强、敏感度高等优点。供 PCR 扩增的疟原虫 DNA 模板,一般通过静脉取血由疟疾患者的感染红细胞获得。但现场静脉采血常常存在着一定的困难,血样的运输及保存亦欠方便。滤纸干血片标本具有制作简单、需血量少、保存运输方便等优点,生物安全性高,适合大规模间日疟筛查工作的开展,临床应用广泛。本文介绍以间日疟原虫的滤纸干血滴为材料,用 2 种不同的方法抽提微量 DNA,通过 PCR 扩增间日疟原虫

[收稿日期] 2011-04-27

[基金项目] 教育部科学技术研究重点资助项目(211079);蚌埠医学院科研基金资助项目(BY0815)

[作者单位] 1. 安徽医科大学病原生物学教研室,安徽合肥 230031;蚌埠医学院 2. 生物科学系 3. 病原生物学教研室,安徽蚌埠 233030

[作者简介] 胡明洁(1972-),女,讲师。

[通讯作者] 沈继龙,博士,博士研究生导师,教授;方强,博士,硕士研究生导师,教授。

乳酸脱氢酶基因 (*Plasmodium vivax* lactate dehydrogenase, *P. vivax* LDH) 特异性片段,并克隆质粒 pGEM-PvLDH,比较 2 种方法的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 间日疟原虫感染血样 采自安徽省蚌埠市区、五河等地临床诊断为疟疾患者的末梢血,年龄 ≥ 18 岁,非孕妇且体温 ≤ 39.5 °C 的患者。告知实验目的并签署知情同意书,制备厚/薄血膜,干燥,甲醇固定,吉姆萨染色,镜检计数红细胞感染率,筛选出确诊为单纯间日疟原虫感染患者。同时记录患者姓名、年龄、性别等自然情况以及主要症状、治疗情况等相关资料。取患者末梢血 3 大滴(每滴约 15 μ l)于灭菌的滤纸上,室温干燥放入塑料袋密封,置于 -20 °C 冰箱保存,供基因组提取用。

1.1.2 菌种和质粒 pGEM-T 载体购自 Promega 公司。大肠埃希菌 *E. coli* DH-5 α 为本室保存。

1.1.3 引物 根据 GenBank 数据库中间日疟原虫 Belem 株 LDH 基因序列(登录号: DQ060151)设计 1 对引物,上游引物为 5'-ATG ACG CCG AAA CCC AAA ATT G-3',下游引物为 5'-TTA AAT GAG CGC CTT CAT CCT TTT AG-3',引物由上海生工生物工程有限公司合成并 ULTRA PAGE 纯化。

1.1.4 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP、dATP 购自 MBI Fermentas 公司,DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit 购自 QIAGEN 公司,PrimeSTARTTM HS DNA Polymerase 试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、1 kbp DNA Ladder Marker、100 bp DNA Ladder Plus Marker 均购自 Takara 公司,琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒 V3.0 为道普生物公司产品,EB 购自 Sigma 公司,琼脂糖购自 Promega 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

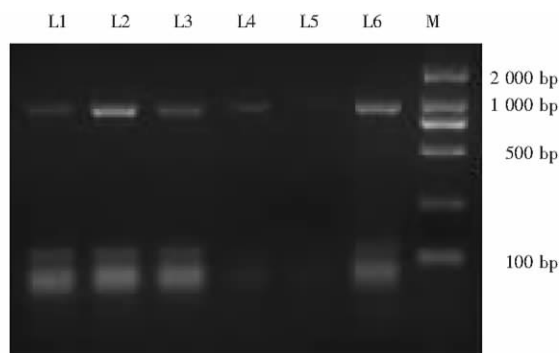
1.2.1 水煮法 取直径约 1 cm 的滤纸干血滴置于 1.5 ml Eppendorf 管内,加 600 μ l 生理盐水溶血,室温置 15 min,轻摇并弃溶血液,加 600 μ l 双蒸去离子水洗涤,弃洗涤液,加 100 μ l 双蒸去离子水煮 15 min,离心 15 min,取上清备用。

1.2.2 改良 QIAamp 提取 gDNA 将血样滤纸片剪至 2~3 枚,直径 3 mm 左右,放入 2.0 ml EP 管中。加入 0.85% 氯化钠溶液 1.0 ml,高速振荡 5~10 s,

置于室温放置 1.5 h(每隔 30 min 混合一下)。13 000 r/min,离心 3 min,弃上清后按照 QIAamp Mini 全血提取试剂盒的说明书进行操作。

2 结果

10 份间日疟原虫滤纸干血片经水煮和试剂盒 2 种间日疟原虫 gDNA 的提取后经 PCR 扩增,1.5% 琼脂糖电泳试剂盒提取的(L1~L3)均出现约 1 000 bp 特异性扩增条带,稍亮,以水煮法提取间日疟原虫 gDNA 为模板的第五泳道未见明显特异性条带(见图 1)。



L1~L3: 试剂盒提取间日疟原虫 gDNA;L4~L6: 水煮法提取间日疟原虫 gDNA;M:D2000 DNA Marker

图 1 2 种方法提取间日疟原虫 gDNA PCR 扩增电泳

以试剂盒提取间日疟原虫 gDNA 为模板均成功经琼脂糖凝胶电泳纯化回收后连接至 pGEM-T 质粒,转化 *E. coli* DH5 α 菌株后挑取菌落进行 PCR 鉴定,重组质粒 pGEM-*P. vivax* LDH 均扩增约 1 000 bp 的特异性条带,而以水煮法提取间日疟原虫 gDNA 为模板有的未能成功克隆。

3 讨论

间日疟原虫虫株间的变异或抗原的多态性研究,常用 PCR、套式 PCR^[6-8]、荧光定量 PCR^[9-10] 等方法,但需静脉取较多量血样,给现场采集血样、保存及运输等造成一定困难。因而,发展一种简便、易于保存及运输的采血方法及效果较好的 DNA 提取方法普遍受到重视。

干血滤纸法是一种简便、易于保存及运输的采样方法,通常适用于大样本的流行病学调查。如何从干血滤纸中有效提取足量的 DNA,是比较重要的一步。我们把 10 份间日疟原虫滤纸干血片经水煮和试剂盒 2 种方法间日疟原虫 gDNA 的提取后 PCR 扩增,1.5% 琼脂糖电泳时,试剂盒提取为模板的均

出现约 1 000 bp 特异性扩增条带 稍亮 ,以水煮法提取间日疟原虫 gDNA 为模板有的泳道未见明显特异性条带。这样在下一步需要基因克隆时 ,将无法进行转化后的菌落提取质粒。由本实验观察水煮法操作简便、快速 ,比较经济实用 ,但所得 DNA 量少 ,纯度不高 ,不宜长期保存 ,PCR 扩增时也可能因纯度和得率不理想而影响扩增效率 ,常常不能保证下一步实验克隆所需 ;但可用于学生做简单 PCR 实验 ,节省实验经费。而试剂盒提取可获得较高的得率 ,在定量检测和复合扩增时受到的影响因素较少 ,成功率较高 ,且均具有简便快速、省时省力的优势 ;然而 ,就成本而言 ,试剂盒相对较高 ,用于科研较好。

2 种 DNA 抽提方法各有利弊 ,可根据实际情况的不同 ,选择适用的 DNA 提取方法 ,快速、经济、安全和高效地从干血滤纸中提取基因组 DNA ,以满足科研或教学工作的需要。

[参 考 文 献]

- [1] 周水森,王漪,房文,等. 2007 年全国疟疾形势[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(6): 401-403.
- [2] de Lacerda MV, Zackiewicz C, Alecrim WD, et al. The neglected *Plasmodium vivax*: are researchers from endemic areas really concerned about new treatment options [J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2007, 40(4): 489-490.
- [3] Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: who cares [J]. Malar J, 2008, 7(Suppl): 59.
- [4] Carlton JM, Adams JH, Silva JC, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax* [J]. Nature, 2008, 455(7214): 757-763.
- [5] Anstey NM, Russell B, Yeo TW, et al. The pathophysiology of vivax malaria [J]. Trends Parasitol, 2009, 25(5): 220-227.
- [6] Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, et al. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6): 2694-2700.
- [7] 徐军强,袁方玉,詹发先,等. 套式 PCR 检测恶性疟原虫与间日疟原虫方法的建立及其应用研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2009, 20(2): 11-14.
- [8] 郭传坤,黎学铭,李锦辉,等. 套式/多重 PCR 诊断疟疾的敏感性、特异性和稳定性初探[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(3): 213-216.
- [9] Khairnar K, Martin D, Lau R, et al. Multiplex real-time quantitative PCR, microscopy and rapid diagnostic immunochromatographic tests for the detection of *Plasmodium spp.*: performance, limit of detection analysis and quality assurance [J]. Malar J, 2009(8): 284.
- [10] Veron V, Simon S, Carme B. Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples [J]. Exp Parasitol, 2009, 121(4): 346-351.

(本文编辑 姚仁斌)

《蚌埠医学院学报》征订启事

《蚌埠医学院学报》创刊于 1976 年 3 月,由安徽省教育厅主管,蚌埠医学院主办,国内外公开发行的综合性医学学术期刊。主要刊登实验医学论文和应用医学论文。设有述评、基础医学、大学生科技园地、临床医学、检验医学、影像医学、药学、预防医学、祖国医学、精神卫生、护理学、技术与方法、综述、个案报道等栏目。

本学报是中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊、中国科技论文与引文数据库、中国期刊全文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国生物医学光盘数据库(CBMdisc)、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、中文科技资料目录-医药卫生、中国生物学文献数据库、《中国生物学文摘》和中国医学文摘(十余种)等收录本学报。并已进入美国《化学文摘》(CA)检索系统。全文入编《中国学术期刊(光盘版)》、“中国知网”、“万方数据-数字化期刊群”等。先后获全国高校优秀科技期刊(B类)二等奖、安徽省高校优秀学报二等奖、安徽省优秀科技期刊三等奖。

本学报现为月刊,每月 15 日出版,国际标准 A4 开本,112 页,铜版纸印刷。标准刊号:ISSN 1000-2200;CN 34-1067/R;CODEN:BYIXEM。邮发代号:26-37,每册定价 8.00 元,全年 96.00 元。欢迎广大读者及时向当地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅,免收邮资费。

邮购地址:安徽省蚌埠市东海大道 2600 号 邮政编码:233030 电话:(0552) 3175456

http://xuebao.bbmc.edu.cn E-mail: bang@chinajournal.net.cn; byxb@163.com

《蚌埠医学院学报》编辑部